

土壤微生物生物量测定的简单方法  
——精氨酸氨化分析

林启美

(中国农业大学土壤和水科学系 北京 100094)

**摘要** 同时测定13种不同土壤精氨酸氨化速率、ATP含量、微生物生物量碳和葡萄糖诱导呼吸速率。精氨酸氨化速率0.1~17.1mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg土,与土壤ATP含量、微生物生物量碳和葡萄糖诱导呼吸速率之间,存在极显著的相关性。比起其它土壤微生物生物量分析方法,精氨酸氨化法既简单、快速,又不需要昂贵的设备,可作为土壤微生物生物量测定方法,但是,当土壤含有大量易分解有机物质时,加入精氨酸时,NH<sub>4</sub>-N产生量极少,多被微生物固定,故此方法不适于此类土壤。

**关键词** 微生物生物量,精氨酸氨化速率,土壤微生物

ARGININE AMMONIFICATION AS A SIMPLE METHOD FOR  
MEASURING SOIL MICROBIAL BIOMASS

LIN Qi-Mei

(Department of Soil and Water Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Arginine ammonification rate, biomass C, soil ATP content and substrate-induced respiration were determined in 13 soils. Arginine ammonification rate was 0.1 to 17.1 mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg soil. There were significant linear relationships between arginine ammonification rate, microbial biomass C, soil ATP content and substrate-induced respiration. Comparing with other techniques, arginine ammonification technique was much simpler, faster and cheaper. This technique can be used as a simple technique for estimating soil microbial biomass except the soil containing high decomposable organic matter.

**Key words** biomass, C, ATP, SIR, arginine ammonification rate.

精氨酸是20种必需氨基酸之一,分子式上有3个氨基团:H<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>。微生物通过4种途径之一,或更多的途径同化精氨酸:①精氨酸-尿酶或精氨酸酶-尿素酰胺酶途径;②精氨酸氨基转移途径;③精氨酸脱氨基途径;④精氨酸脱羧途径。除了精氨酸氨基转移途径,钹是其他3个途径的最终产物。Alef和Kieiner<sup>[1]</sup>发现土壤中50种微生物能利用精氨酸作为其C和N源,在一定条件下,精氨酸氨化速率与土壤中微生物生物量呈正比例关系<sup>[2]</sup>。Hund等<sup>[3]</sup>试图用精氨酸氨化速率作为有机污染对土壤微生物影响的指标。精氨酸氨化技术作为测定土壤微生物生物量的一种简捷方法,与其他土壤微生物生物量分析方法的可比性,目前国内外研究不多,还需进一步确证此方法的可行性。

\* BBSRC和BASF资助项目,本文是在Brookes, P. C. 博士指导下完成,谨表谢意。

收稿日期:1996-10-08,修改稿收到日期:1997-08-21。

本研究将测定不同土壤精氨酸氨化速率,并与土壤微生物生物量碳、土壤 ATP 含量和葡萄糖诱导呼吸速率比较,试图建立相互间的关系,从而评价精氨酸氨化速率作为土壤微生物生物量的指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤

13种土壤采自洛桑试验站长期定位试验点,用荷兰土钻采集,草地和林地土采0~10cm 的土层土壤,耕地采0~23cm 的土层土壤,采集的湿土迅速过2mm 筛,并去掉植物残体和可见土壤动物,调节土壤湿度至40%的田间持水量,再放入封闭的铁桶内培养7d(25℃),桶内装有水和苏打石灰粉,以保持桶内的湿度和吸收培养时释放的 CO<sub>2</sub>。培养的土壤放在5℃下保存,或迅速分析。13种土壤的理化性质见表1。

### 1.2 土壤处理

3、5、6、8、9和10号土加入磨细的黑麦草(2% W/W),调节至50%的田间持水量,在25℃下培养10d。其它土壤经氟仿熏蒸(25℃,24h),去掉氟仿后培养10d,培养方法同上。

### 1.3 微生物生物量测定

生物量碳用熏蒸提取法测定<sup>[4]</sup>,生物量碳(*B<sub>c</sub>*)按下面的公式计算:

$$B_c = 2.22E_c$$

*E<sub>c</sub>* 为熏蒸土壤 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>提取的碳量与不熏蒸土壤 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>提取的碳量的差值。

土壤 ATP 含量用三氯乙酸-磷酸氢二钠-百草枯提取剂浸提,用荧光素-荧光素酶荧光反应测定提取液中 ATP 的含量,详细方法见 Jenkinson 和 Oades<sup>[5]</sup>。

葡萄糖诱导 CO<sub>2</sub>呼吸速率:称取相当于10~40g 烘干土的湿土,放入250ml 磨口的三角瓶中,加入葡萄糖粉剂(6mg/g 土,用前与滑石粉以1:4的比例混合)与土壤充分混匀30min 后,盖上盖子,在25℃下培养2h,用10ml 注射器抽取三角瓶中的空气,用气相色谱测定 CO<sub>2</sub>含量。详细方法见文献[6]。

表1 土壤性质

Table 1 Soil properties

土壤 Soil	地点 Location	深度(cm) Depth	有机碳 O. C. (g/kg)	全氮 T. N. (g/kg)	pH	粘粒<2μm Clay (g/kg)	覆盖物 Cover	NH <sub>4</sub> -N (mg/kg)
1	B. Nil 号小区	0~23	8.8	0.95	7.5	200	冬小麦	0.2
2	B. FYM 号小区	0~23	29.4	2.73	7.2	230	冬小麦	0.9
3	B. N4PK 号小区	0~23	10.2	1.16	7.3	220	冬小麦	0.2
4	B. 林地	0~10	44.2	4.01	6.7	260	落叶林	0.6
5	H. 草地	0~10	40.8	3.64	4.8	220	牧草	1.6
6	G. 林地	0~10	66.5	3.89	3.2	280	落叶林	2.4
7	G. 休闲地	0~23	21.7	1.83	4.9	360	休闲地	0.6
8	W. 长期休闲地	0~10	6.9	0.45	5.1	90	休闲地	0.1
9	W. 连作32号小区	0~10	12.1	1.20	6.4	140	牧草	0.5
10	W. 连作72号小区	0~10	20.0	1.47	6.1	130	牧草	1.6
11	W. 连作75号小区	0~10	17.5	1.44	6.2	120	三叶草/牧草	1.7
12	W. 连作67号小区	0~10	11.4	1.09	6.0	100	冬蚕豆	1.5
13	W. 连作60号小区	0~10	14.23	1.27	6.4	150	三叶草/牧草	1.9

### 1.4 精氨酸氨化速率

称取10g 湿土,放入125ml 塑料瓶中,加入精氨酸溶液(3mg/kg 土,调节土壤湿度至200%田间持水量),在25℃下培养1h 后,将塑料瓶放在-15℃下,以终止氨化作用。至少4h 后,在室温下解冻土壤,立刻用2mol/L KCl 浸提(1:4土水比)(25℃下振荡15min,200rev/min),用瓦氏42号滤纸过滤,滤液应迅速分析,或存放在-15℃下。提取液中 NH<sub>4</sub>-N 用自动流动注射仪(AlphenRFA/2)测定。同时测定不加精氨酸土壤中 NH<sub>4</sub>-N 的释放量。精氨酸氨化速率为:加精氨酸土壤释放的 NH<sub>4</sub>-N 减去不加精氨酸土壤释放的 NH<sub>4</sub>-N,以 mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg 土来表示。所有测定都做3次重复,结果皆用烘干土表示,数据分析用 Genstat 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 精氨酸氨化速率与土壤性质的关系

13个土壤精氨酸氨化速率0.1~17.1mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg土,施用无机肥料的土壤(土壤3)比施用有机肥料的土壤(2号土),精氨酸氨化速率要低,分别为3.6和6.5mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg土,这说明施用有机肥料可提高土壤微生物生物量。Alef和Kleiner<sup>[2]</sup>分析34个土壤,精氨酸氨化速率为0.39~10.14mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg土,与本文的结果相当,但Kaiser等<sup>[7]</sup>所得的结果要低得多,为0.03~2.71mg NH<sub>4</sub>-N/h·kg土。

Alef和Kleiner<sup>[2]</sup>发现精氨酸氨化速率与土壤有机碳和全氮含量存在显著的相关性,Alef等<sup>[8]</sup>及Kaiser等<sup>[7]</sup>也得到相似的结果。本研究发现精氨酸氨化速率与土壤有机碳和全氮的相关性不显著(*r*分别为0.66和0.49)。但是,如果将一个酸性土壤(6号土)从统计中剔除,则相关性达到显著水准(*P*<0.001)(图1)。有机碳含量高不可能是影响相关性的因素,因为4和5号土壤同样有较多的有机碳,并不影响相关性,可能的原因是土壤酸度低,导致相关性降低。类似的结果,在生物量碳与土壤有机碳之间也有报道<sup>[9]</sup>,酸性土壤微生物生物量碳占土壤有机碳的比例,要小于其它土壤。

2.2 精氨酸氨化速率与土壤ATP含量、微生物生物量碳及葡萄糖诱导CO<sub>2</sub>呼吸速率之间的关系

Alef和Kleiner<sup>[2]</sup>发现精氨酸氨化速率与葡萄糖诱导O<sub>2</sub>消耗速率有显著的相关性(O<sub>2</sub>=2.51NH<sub>4</sub>-N)。Alef等<sup>[8]</sup>也报道NH<sub>4</sub>-N释放量与土壤ATP含量及葡萄糖诱导CO<sub>2</sub>呼吸率有较高的相关性,但是,Kaiser等<sup>[7]</sup>发现这一相关性并不太高。Wilke<sup>[10]</sup>也指出精氨酸氨化速率不能反映无机污染对土壤N转化的影响。本试验的结果表明,精氨酸氨化速率与生物量碳、土壤ATP含量及葡萄糖诱导CO<sub>2</sub>呼吸速率之间,存在显著的相关性(图2),如果一个酸性土壤(土壤6)从统计分析中剔除,则相关性大大提高。本文所得的精氨酸氨化速率与诱导CO<sub>2</sub>呼吸率的回归方程与Alef和Kleiner<sup>[2]</sup>所得的结果有极强的可比性,显然O<sub>2</sub>的消耗与CO<sub>2</sub>的释放有几乎1:1的关系,每克生物量碳的精氨酸氨化速率为0.01g NN<sub>4</sub>-N。

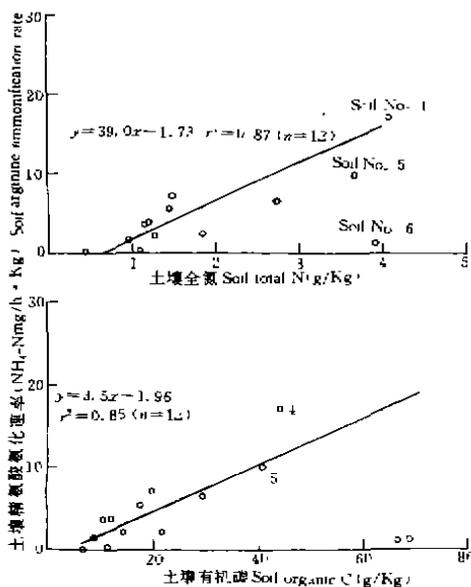


图1 精氨酸氨化速率与土壤全氮和有机碳的关系(去掉6号土)

Fig. 1 The relationship between arginine ammonification rate and soil total N and organic C (excluded soil No. 6)

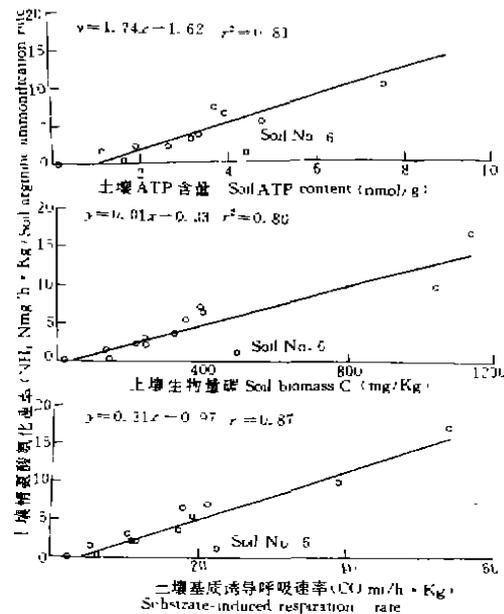


图2 精氨酸氨化速率与生物量碳、土壤ATP含量和基质诱导呼吸速率(SIR)之间的关系

Fig. 2 The relationship between arginine ammonification rate and biomass C, soil ATP content and substrate-induced respiration rate (SIR)

Alef & Klerner<sup>[2]</sup>指出:如果土壤含有过量的  $\text{NN}_4\text{-N}$ , 精氨酸氨化可能受到抑制, 他们所用的 34 个土壤  $\text{NH}_4$  含量为  $0.33\sim 31\text{mg/kg}$  土, 本文所用的 13 种土壤  $\text{NN}_4\text{-N}$  含量  $0.1\sim 2.4\text{mg NN}_4\text{-N/kg}$  土 (表 1), 除了 6 号土壤精氨酸氨化作用受到抑制外, 其他土壤没有发现精氨酸氨化受到抑制的现象。6 号土壤不仅  $\text{NH}_4$  含量最高, 而且呈极强的酸性, 由于酸性土壤真菌是优势菌落, 是这种微生物群落结构的差异, 造成精氨酸氨化速率的降低, 还是由于酸性土壤中  $\text{Al}$ 、 $\text{Fe}$  等离子子的存在, 抑制微生物分解精氨酸, 有待进一步的研究。

加入黑麦草和熏蒸后培养的土壤, 精氨酸加入后, 释放的  $\text{NN}_4\text{-N}$  极少, 甚至出现负值 (表 2), 主要原因是这些土壤含有大量易分解的有机物质, 微生物在分解这些有机物时, 吸收固定  $\text{NH}_4\text{-N}$ 。所以精氨酸氨化方法, 不适用于含有大量易分解有机物的土壤。

### 3 结论

当向土壤加入精氨酸, 并培养一段时间后, 释放的  $\text{NH}_4\text{-N}$  与土壤 ATP 含量、微生物生物量碳及葡萄糖诱导  $\text{CO}_2$  呼吸速率之间, 存在较显著的相关性。精氨酸氨化速率可作为土壤微生物生物量的指标。比起其它方法, 该方法更简单、快速、便宜。但是, 该方法不适用于含有大量易分解有机物的土壤, 因为精氨酸矿化的  $\text{NH}_4\text{-N}$  重新被微生物固定。

表 2 加入黑麦草的土壤和熏蒸的土壤精氨酸氨化速率 ( $\text{NH}_4\text{-N mg/h}\cdot\text{kg}$  土)

Table 2 Arginine ammonification rate in ryegrass-amended soils and fumigated-incubated soils

土壤 Soil No.	加入黑麦草 <sup>a</sup> Ryegrass-amended	熏蒸 <sup>b</sup> Fumigated-incubated
3	7.3	-2.2
5	24.6	-2.5
6	-20.3	-11.5
8	-1.1	-0.8
9	7.3	-2.6
10	10.0	-16.5
Mean $\pm$ s. e	4.6 $\pm$ 2.79	-6.0 $\pm$ 2.76

a, 加入黑麦草后培养 10d 测定, b, 土壤熏蒸, 去掉熏蒸后培养 10d 测定。

### 参 考 文 献

- 1 Alef K & Kleiner D. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potential in soil. *Soil Biol. & Biochem.*, 1986, **18**: 233~235
- 2 Alef K & Kleiner D. Applicability of arginine ammonification as an indicator of microbial activity in different soils. *Biol. & Fert. of Soil.*, 1987, **5**: 148~151
- 3 Hund K, et al. A critical estimation of methods for measuring side-effects of chemicals on micro-organisms in soil. *Chemosphere*, 1988, **17**: 1183~1188
- 4 Wu J, et al. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction——An automated procedure. *Soil Biol. & Biochem.*, 1990, **22**: 1167~1169
- 5 Jenkinson D S & Odes J M. A method for measuring adenosine triphosphate in soil. *Soil Biol. & Biochem.*, 1979, **11**: 193~199
- 6 林启美. 葡萄糖加入形式对基质诱导呼吸量测定的影响. 中国农业大学学报, 1997, (3): 250~256
- 7 Kaiser E A, et al. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biol. & Biochem.*, 1992, **4**: 675~683
- 8 Alef K, et al. A comparison of methods of estimate microbial biomass and N-mineralization in agricultural and grassland soils. *Soil Biol. & Biochem.*, 1988, **20**: 561~565
- 9 Anderson T H & Domsch K H. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. & Biochem.*, 1989, **21**: 471~479
- 10 Wilke B M. Long-term effects of different inorganic pollutants on nitrogen transformations in a sandy cambisol. *Biol. & Fert. of Soil*, 1989, **7**: 254~258